

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

①2 **Offenlegungsschrift**
①0 **DE 198 42 991 A 1**

⑤1 Int. Cl. 7:
C 12 Q 1/68

②1 Aktenzeichen: 198 42 991.6
②2 Anmeldetag: 21. 9. 1998
④3 Offenlegungstag: 23. 3. 2000

DE 198 42 991 A 1

⑦1 Anmelder:
Behrens, Meinhard, Dr., 33330 Gütersloh, DE;
Unthan, Monika, Dr., 33803 Steinhagen, DE; Latus,
Norbert, 33397 Rietberg, DE

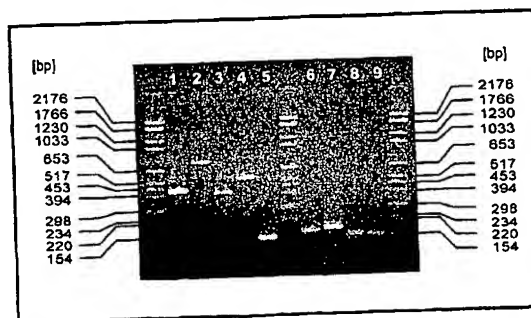
⑦4 Vertreter:
Hanewinkel, L., Dipl.-Phys., Pat.-Anw., 33102
Paderborn

⑦2 Erfinder:
gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Genetisches Analyseverfahren zur Abstammungsüberprüfung biologischer Materialien durch Verwendung artspezifischer PCR-Primer

⑤7 Verschiedene neue tierart- und pflanzenartspezifische Primer sowie das damit verbundene analytische Verfahren zur Abstammungsüberprüfung biologischer Materialien tierischer und pflanzlicher Herkunft durch Analyse der in den Materialien vorhandenen Erbsubstanz DNA durch artspezifische Amplifizierung und nachfolgender Identifizierung der mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) synthetisierten PCR-Produkte sind Gegenstand des Verfahrens. Die für den Nachweis eingesetzten PCR-Primer sind artspezifisch, und das Vorhandensein der jeweiligen DNA tierischer und pflanzlicher Herkunft wird direkt nach der Vervielfältigungsreaktion PCR angezeigt. Das Entstehen der artspezifischen PCR-Produkte wird beispielsweise mittels Elektrophorese im Agarose- oder Polyacrylamidgel einfach überprüft.



Tierartspezifische PCR-Produkte aus je 1 %igen Fleischzumischungen der jeweiligen Tierarten.

In den Spuren:

- 1: Rind 2
- 2: Schwein 2
- 3: Huhn 2
- 4: Pute 2
- 5: Pferd 1
- 6: Rind 1
- 7: Schwein 1
- 8: Huhn 1
- 9: Pute 1

Links, rechts und in der Mitte sind DNA-Längenstandards aufgetragen.
Die Fragmentlängen sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

DE 198 42 991 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft tier- und pflanzenart-spezifische Primerpaare sowie ein analytisches Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung tierischer und pflanzlicher Bestandteile durch Untersuchung der in den Materialien vorhandenen DNA. Hierbei werden nach Isolation der Erbsubstanz DNA bestimmte artspezifische DNA-Bereiche vervielfältigt.

In der Nahrungsmittel- aber auch beispielsweise in der Futtermittelindustrie gewinnt die eindeutige Identifizierbarkeit von biologischen Materialien im Rahmen der Qualitätssicherung eine zunehmende Bedeutung. Zur Zeit wird in der Analytik für derartige Untersuchungen vorwiegend die Spezifität der Proteine herangezogen. Das bedeutet, die Analyse erfolgt mittels immunchemischer Methoden durch die Verwendung entsprechender Antikörper gegen die nachzuweisenden tierischen oder pflanzlichen Bestandteile. Nicht selten sind jedoch die antigen-wirkenden Komponenten, gegen die die Antikörper gerichtet sind, durch die Vorbehandlung der tierischen und pflanzlichen Bestandteile in den Nahrungs- oder Futtermitteln nicht mehr vorhanden oder nicht mehr intakt, so daß keine oder keine ausreichende Antikörper-Antigen-Wechselwirkung stattfinden kann und somit eine immunchemische Detektion schlecht oder gar nicht funktioniert.

Ein weiteres Identifizierungsverfahren auf Proteinniveau beruht auf dem Vergleich der Isoenzymmuster. Bei diesem Verfahren beobachtet man bei den auftretenden Proteinmustern jedoch eine starke Abhängigkeit vom Gewebetyp. Im Untersuchungsmaterial jedoch ist der Gewebetyp, aus dem das Material stammt, häufig nicht mehr feststellbar. Darüberhinaus wird auch dieses Verfahren durch die Veränderungen der Enzyme bei Verarbeitungsprozessen eingeschränkt.

Bereits Ende der 80er Jahre wurde von Bauer et al. (Empfindlicher elektrophoretischer Nachweis von Schweinefleisch in erhitzten Rindfleisch/Schweinefleisch-Mischungen, Fleischwirtschaft 67, 1141 (1987)) gezeigt, daß die Erbsubstanz DNA durch Hitze oder andere Verarbeitungsschritte und Zusatzstoffe nur gering beeinflußt wird.

Weiterhin hat Meyer et al. (DNA-Sonden zur Tierartidentifizierung in verarbeiteten Lebensmitteln, Fleischwirtschaft, 74 (11), 1237-1238 und 1542-1551 (1994)) DNA-Sonden beschrieben, die für die Identifizierung der gängigen Fleischsorten eingesetzt werden können. Dabei werden tierart-spezifische DNA-Sonden zur Identifizierung von DNA aus tierischen Gewebeproben verwendet. Die Isolation tierart-spezifischer DNA-Sonden und das Verfahren selbst sind relativ arbeits- und zeitaufwendig, so daß es als Routine-Untersuchungsmethode wenig praktikabel ist. Darüberhinaus liegt die Nachweisgrenze in Abhängigkeit vom Sondentyp meistens bei ca. 5%, bestenfalls bei ca. 1%. Das heißt, die Nachweisempfindlichkeit ist vielfach nicht ausreichend.

Ein anderes Identifizierungsverfahren, welches erstmals von Meyer et al. (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism: A simple Method for Species Identification in Food, Journal of AOAC International, 78, 1542-1551 (1995)) für Fleischsorten beschrieben wurde, arbeitet mit "universellen" PCR-Primern, die die Vervielfältigung von DNA-Abschnitten verschiedener Tierarten ermöglichen, sofern die PCR-Primer ein hohes Maß an Übereinstimmung zu den Zielbereichen der DNA der betreffenden Tierart(en) aufweisen. Bei diesem PCR-Verfahren werden gleiche DNA-Bereiche vervielfältigt, die - unabhängig von der Tierart-DNA - gleich lang sind, aber innerhalb dieses Moleküls tierart-spezifische Sequenzunterschiede aufweisen. Diese vervielfältigten DNA-Bereiche,

sog. PCR-Produkte, werden in einem zweiten Schritt einer Spaltung mit Restriktionsendonukleasen unterzogen. Aufgrund von Sequenzunterschieden zwischen den PCR-Produkten der DNA verschiedener Tierarten entstehen nach enzymatischer Spaltung DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die nach elektrophoretischer Trennung für die Identifizierung von Tierarten herangezogen werden können. Die Analyse der tierart-spezifischen DNA-Fragmentmuster wird auch als RFLP-Analyse (RFLP = restriction fragment length polymorphism) bezeichnet. Zwecks Identifizierung der Tierarten werden die DNA-Fragmentmuster mit Fragmentmustern definierter Referenzarten verglichen. Dieses Verfahren ist bei Vorhandensein nur einer einzigen Art im zu untersuchenden Material anwendbar, scheitert jedoch bei komplexen Vermischungen, wie sie zum Beispiel bei Lebens- bzw. Futtermittelproben häufig auftreten. Da "universelle" Primer in Abhängigkeit von der Tier- und Pflanzenart unterschiedlich gut binden, werden die Mischungen, DNA-Moleküle bestimmter Arten, unter Umständen nur schwach amplifiziert und entziehen sich somit einer RFLP-Analyse. Selbst bei vergleichbarer Amplifikation jeder vorliegenden Tier-DNA ist eine RFLP-Analyse bei komplexen Mischungen schwierig, da sich einzelne Fragmente oder Fragmentgruppen häufig nicht mehr einer bestimmten Tierart zuordnen lassen. Bei hocherhitzten Produkten stößt das Verfahren ebenfalls an seine Grenzen. Es stehen nur noch wenig hinreichend große DNA-Bruchstücke zur Verfügung, die als Bindungsstellen für die beiden PCR-Primer dienen können. Außerdem gestalten sich RFLP-Analysen als zeitaufwendig und sind daher als schnelle und verlässliche Routine-Untersuchungsmethoden ebenfalls geeignet.

Das der Erfindung zugrundeliegende Problem besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem es gelingt, in relativ kurzer Zeit die Abstammung biologischer Materialien, die beispielsweise als Nahrungs- oder Futtermittel Verwendung finden, zu bestimmen. Folgende Schritte werden nacheinander durchgeführt:

- Isolation der Gesamt DNA aus dem Untersuchungsmaterial,
- Einsatz mindestens eines artspezifischen Primerpaares,
- Vervielfältigung der tierischen bzw. pflanzlichen DNA mittels PCR,
- Detektion des jeweils artspezifischen PCR-Produktes mittels Elektrophorese, wobei das lösungsspezifische Primerpaar jeweils aus solchen Primern besteht, die ausschließlich komplementär zur nachzuweisenden tierischen bzw. pflanzlichen DNA sind

Der Nachweis der jeweiligen Tier- bzw. Pflanzenart wird durch die Verwendung entsprechender Primerpaare bei der Vervielfältigung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht. Die in der Probe befindliche Tier- bzw. Pflanzenart wird durch die Synthese des artspezifischen DNA-Fragmentes bei der PCR direkt in der sich anschließenden Elektrophorese angezeigt. Die Sichtbarmachung der spezifischen DNA-Fragmente im Agarose- oder Polyacrylamidgel erfolgt durch Anfärbung der entsprechenden DNA-Syntheseprodukte.

Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den Unteransprüchen angegeben. Geeignete artspezifische Primerpaare sind in den Nebenansprüchen spezifiziert.

Für die Primerauswahl zur Identifizierung tierischer DNA einzelner Tierarten wurden DNA-Bereiche des mitochondrialen Cytochrom b-Gens gewählt.

Die Identifizierung pflanzlicher DNA erfolgt mittels spezifischer PCR-Primer für das Soja-Lectin-Gen sowie Primer

für die intergenetische Region von Weizen, die zwischen den Genen für die ribosomale 25S- und 18S-RNA liegt. Durch umfangreiche Sequenzvergleiche mit aus der Literatur bekannten Cytochrom b-Sequenzen ließen sich verschiedene tierartspezifische Primer identifizieren, die für das erfindungsgemäße Identifizierungsverfahren genutzt werden. Bei der Suche nach pflanzenartsspezifischen Primern für den Soja- bzw. Weizennachweis wurde analog verfahren. Durch die Verfügbarkeit von teilweise mehreren Primerpaaren, die PCR-Produkte unterschiedlicher Fragmentlängen bilden, lassen sich in Abhängigkeit vom Degradationsgrad der Probe und damit auch der DNA die meisten analytischen Fragestellungen lösen. Insbesondere bei hochdegradiertem Untersuchungsmaterial (z. B. Vollkonserven, Fertiggerichten) empfiehlt sich der Einsatz dichter beieinanderliegender Primerpaare. Da in solchen Proben auch die DNA-Moleküle verhältnismäßig kurz sind, lassen sich somit bei der PCR noch DNA-Syntheseprodukte erzielen. Voraussetzung ist, daß sich in der Probe zumindest einige DNA-Bruchstücke mit der Mindestlänge der Primerabstände befinden.

Die Tatsache, daß die für die Primerauswahl genutzten Gene bzw. DNA-Abschnitte mit denen die Primer bei der Vervielfältigungsreaktion PCR eine Paarung (Hybridisierung beim Annealing während des PCR-Zyklus) eingehen in vielfacher Kopienzahl im Genom dieser Organismen vorkommen, ist für die Empfindlichkeit des Analyseverfahrens enorm vorteilhaft. Je nach Ausgestaltung der PCR läßt sich die Nachweisempfindlichkeit bis auf 0,01% einstellen. Für die Analyse sind Gesamt-DNA-Mengen in ng-Maßstab ausreichend. Das bedeutet, daß je nach Verarbeitung und Komplexität der Probe Untersuchungsmaterial im mg- bis g-Bereich erforderlich ist. Mit diesem erfindungsgemäßen Verfahren können praktisch alle Nahrungs- und Futtermittel überprüft werden.

Weitere Anwendungsfelder des Verfahrens sind beispielsweise in der forensischen Medizin oder bei Reinheitsüberprüfungen von Rohstoffen oder Endprodukten der kosmetischen oder pharmazeutischen Industrie. Prinzipiell lassen sich alle Materialien biologischen Ursprungs auf Authentizität bzw. auf Kontaminationen tierischer/pflanzlicher Herkunft überprüfen – vorausgesetzt es befinden sich zumindest DNA-Reste im Untersuchungsmaterial.

Die Fig. 1-3 zeigen schematisch die Position der artspezifischen PCR-Primer im Cytochrom b-Gen, im Soja-Lectin-Gen sowie im intergenetischen Bereich der ribosomalen 25S- und 18S-RNA-Gene.

Fig. 4 zeigt die tierartspezifischen PCR-Produkte, die bei Verwendung der jeweiligen Primerpaare bei der PCR synthetisiert werden.

Die Fig. 5 zeigt die pflanzenartsspezifischen PCR-Produkte, die bei Verwendung der weizen- bzw. sojaspezifischen Primerpaare bei der PCR synthetisiert werden.

In Fig. 1 sind die Positionen artspezifischer Primer im Cytochrom b-Gen dargestellt, die die daraus resultierenden PCR-Produkte links und rechts begrenzen.

Das Basenpaar "Huhn 1" ergibt ein resultierendes PCR-Produkt mit einer Länge von 159 bp.

Das Basenpaar "Huhn 2" ergibt ein resultierendes PCR-Produkt mit einer Länge von 416 bp.

Das Basenpaar "Pute 1" ergibt ein resultierendes PCR-Produkt mit einer Länge von 149 bp.

Das Basenpaar "Pute 2" ergibt ein resultierendes PCR-Produkt mit einer Länge von 550 bp.

Das Basenpaar "Rind 1" ergibt ein resultierendes PCR-Produkt mit einer Länge von 166 bp.

Das Basenpaar "Rind 2" ergibt ein resultierendes PCR-Produkt mit einer Länge von 431 bp.

Das Basenpaar "Schwein 1" ergibt ein resultierendes

PCR-Produkt mit einer Länge von 182 bp.

Das Basenpaar "Schwein 2" ergibt ein resultierendes PCR-Produkt mit einer Länge von 769 bp.

Das Basenpaar "Pferd 1" ergibt ein resultierendes PCR-Produkt mit einer Länge von 146 bp.

Das Basenpaar "Weizen" ergibt ein resultierendes PCR-Produkt mit einer Länge von 109 bp.

Das Basenpaar "Soja" ergibt ein resultierendes PCR-Produkt mit einer Länge von 118 bp.

In Fig. 2 sind die PCR-Primer, die bei Position 1215-1236 bzw. 1310-1332 im Lectin-Gen wirksam sind, dargestellt. Das resultierende PCR-Produkt weist eine Länge von 118 Basenpaaren auf.

In Fig. 3 sind schematisch die Primer, des intergenetischen Bereiches der 25S- und 18S-RNA Gene dargestellt. Das daraus resultierende PCR-Produkt weist eine Länge von 109 Basenpaaren auf.

In Fig. 4 werden die tierartspezifischen PCR-Produkte, die bei Verwendung der jeweiligen Primerpaare bei der Polymerasekettenreaktion synthetisiert werden, gezeigt.

Tierartspezifische PCR-Produkte aus je 1%igen Fleisch-zumischungen der jeweiligen Tierarten.

In den Spuren:

- 1: Rind 2
- 2: Schwein 2
- 3: Huhn 2
- 4: Pute 2
- 5: Pferd 1
- 6: Rind 1
- 7: Schwein 1
- 8: Huhn 1
- 9: Pute 1.

Links, rechts und in der Mitte sind DNA-Längenstandards aufgetragen. Die Fragmentlängen sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

In Fig. 5 werden die pflanzenartsspezifischen PCR-Produkte, die bei Verwendung der weizen- bzw. sojaspezifischen Primerpaare bei der Polymerasekettenreaktion synthetisiert werden, gezeigt.

Pflanzenartsspezifische PCR-Produkte aus jeweils 0,01%igen Zumischungen von Weizen (Spur 1) und Soja (Spur 2). Links ist ein DNA-Längenstandard aufgetragen. Die Fragmentlängen sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

Beim beschriebenen Verfahren werden vorteilhafterweise Standardtechniken der Gentechnologie wie DNA-Isolierung, PCR und Gelelektrophorese miteinander kombiniert. Die DNA-Isolierung erfolgt mittels Standard-Isolationsmethoden durch Zellaufschluß, Extraktion von Fett- und Proteinen und anschließender Ausfällung der Nukleinsäuren. Aufgrund der Anwendung des Amplifikationsverfahrens PCR und den erfindungsgemäßen Primern sind hohe Nachweisempfindlichkeiten gegeben. Diese liegen in Abhängigkeit der gewählten PCR-Bedingungen und Art der Probe bei 0,01 bis 1%. Der Wegfall weitergehender Analysen im Anschluß an die PCR durch enzymatische Spaltung der PCR-Produkte, wie es bei der üblichen PCR-RFLP-Analyse notwendig ist, ergibt einen hohen Zeitgewinn, so daß mit diesem erfindungsgemäßen Verfahren ein hoher Probendurchsatz möglich ist.

Verschiedene neue tierart- und pflanzenartsspezifische Primer sowie das damit verbundene analytische Verfahren zur Abstammungsüberprüfung biologischer Materialien tierischer und pflanzlicher Herkunft durch Analyse der in den Materialien vorhandenen Erbsubstanz DNA durch artspezifische Amplifizierung und nachfolgender Identifizierung der mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) synthetisierten PCR-Produkte sind Gegenstand des Verfahrens. Die für den Nachweis eingesetzten PCR-Primer sind artspezifisch, und

das Vorhandensein der jeweiligen DNA tierischer und pflanzlicher Herkunft wird direkt nach der Vervielfältigungsreaktion PCR angezeigt. Das Entstehen der artspezifischen PCR-Produkte wird beispielsweise mittels Elektrophorese im Agarose- oder Polyacrylamidgel einfach überprüft. Für die Überprüfung auf Vorhandensein von DNA der entsprechenden Spezies im Untersuchungsmaterial werden die unten aufgeführten Primer benötigt. Die Nukleotidsequenzen der artspezifischen Primer lauten in der gebräuchlichen Einbuchstaben-Schreibweise wie folgt:

Tierartspezifische PCR-Primer:

Huhn 1U: 5'-GAC ACA TCC CTA GCC-3'
Huhn 1R: 5'-CTT GTA GAG GTA GGA G-3'
Huhn 2U: 5'-CTC CTA CCT CTA CAA G-3'
Huhn 2R: 5'-GGC TAG TGT TAG GAA T-3'
Pute 1U: 5'-TTG CAT TCT CTT CTG TG-3'
Pute 1R: 5'-TTT ATA TAG GTA CGA ACC A-3'
Pute 2U: 5'-TTG CAT TCT CTT CTG TG-3'
Pute 2R: 5'-GGG TTA ATG TGA GTA AG-3'
Rind 1U: 5'-CAT CAT AGC AAT TGC CAT-3'
Rind 1R: 5'-GTA CTA GTA GTA TTA GAG C-3'
Rind 2U: 5'-CTT AGG GGC CCT CTT AC-3'
Rind 2R: 5'-CGA TTG TGC CGG CCG-3'
Schwein 1U: 5'-TGT TGG CCC TAG TAG C-3'
Schwein 1R: 5'-GCC GAT GAT GAT GAA C-3'
Schwein 2U: 5'-GTC CTA CTA TTT ACC GTT-3'
Schwein 2R: 5'-TTC CAT GAT GAT AGT GA-3'
Pferd 1U: 5'-CAC AGC CCT GGT AGT-3'
Pferd 1R: 5'-GCA AGA TCA GGA GGA GGA GT-3'.

Pflanzenartspezifische POR-Primer:

Soja 1U: 5'-GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C-3'
Soja 1R: 5'-GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG-3'
Weizen 1U: 5'-GCG GCG TGT GCC ACG TAC GTG GTT T-3'
Weizen 1R: 5'-GAA CGG GCG TTA CGT GGA CAC GGG A-3'.

In Abhängigkeit von der Ausgestaltung der POR ist eine hohe Nachweisempfindlichkeit auch in thermisch behandelten oder anderweitig prozessierten Materialien gegeben. Die Nachweisempfindlichkeit läßt sich im Bedarfsfall bis auf ca. 0,01% einstellen.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Abstammungsnachweis biologischer Materialien, bei dem folgende Schritte nacheinander ausgeführt werden:

- Isolation der Gesamt DNA aus dem Untersuchungsmaterial,
- Einsatz mindestens eines artspezifischen Primerpaares,
- Vervielfältigung der tierischen bzw. pflanzlichen DNA mittels PCR,
- Detektion des jeweils artspezifischen PCR-Produktes mittels Elektrophorese, **dadurch gekennzeichnet**, daß jedes Primerpaar jeweils aus solchen Primern besteht, die ausschließlich komplementär zur nachzuweisenden tierischen bzw. pflanzlichen DNA sind

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Huhn-DNA als Primerpaar
Huhn 1U: 5'-GAC ACA TCC CTA GCC-3'
Huhn 1R: 5'-CTT GTA GAG GTA GGA G-3' und/oder
Huhn 2U: 5'-CTC CTA CCT CTA CAA G-3'
Huhn 2R: 5'-GGC TAG TGT TAG GAA T-3' eingesetzt wird.

3. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Pu-

ten-DNA als Primerpaar

Pute 1U: 5'-TTG CAT TCT CTT CTG TG-3'

Pute 1R: 5'-TTT ATA TAG GTA CGA ACC A-3' und/oder

Pute 2U: 5'-TTG CAT TCT CTT CTG TG-3'

Pute 2R: 5'-GGG TTA ATG TGA GTA AG-3' eingesetzt wird.

4. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Rind-DNA als Primerpaar

Rind 1U: 5'-CAT CAT AGC AAT TGC CAT-3'

Rind 1R: 5'-GTA CTA GTA GTA TTA GAG C-3' und/oder

Rind 2U: 5'-CTT AGG GGC CCT CTT AC-3'

Rind 2R: 5'-CGA TTG TGC CGG CCG-3' eingesetzt wird.

5. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Schwein-DNA als Primerpaar

Schwein 1U: 5'-TGT TGG CCC TAG TAG C-3'

Schwein 1R: 5'-GCC GAT GAT GAT GAA C-3' und/oder

Schwein 2U: 5'-GTC CTA CTA TTT ACC GTT-3'

Schwein 2R: 5'-TTC GAT GAT GAT AGT GA-3' eingesetzt wird.

6. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Pferd-DNA als Primerpaar

Pferd 1U: 5'-CAC AGC CCT GGT AGT-3'

Pferd 1R: 5'-GCA AGA TCA GGA GGA GGA GT-3' eingesetzt wird.

7. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Soja-DNA als Primerpaar

Soja 1U: 5'-GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C-3'

Soja 1R: 5'-GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG-3' eingesetzt wird.

8. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von Weizen-DNA als Primerpaar

Weizen 1U: 5'-GCG GCG TGT GCC ACG TAC GTG GTT T-3'

Weizen 1R: 5'-GAA CGG GCG TTA CGT GGA CAC GGG A-3' eingesetzt wird.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

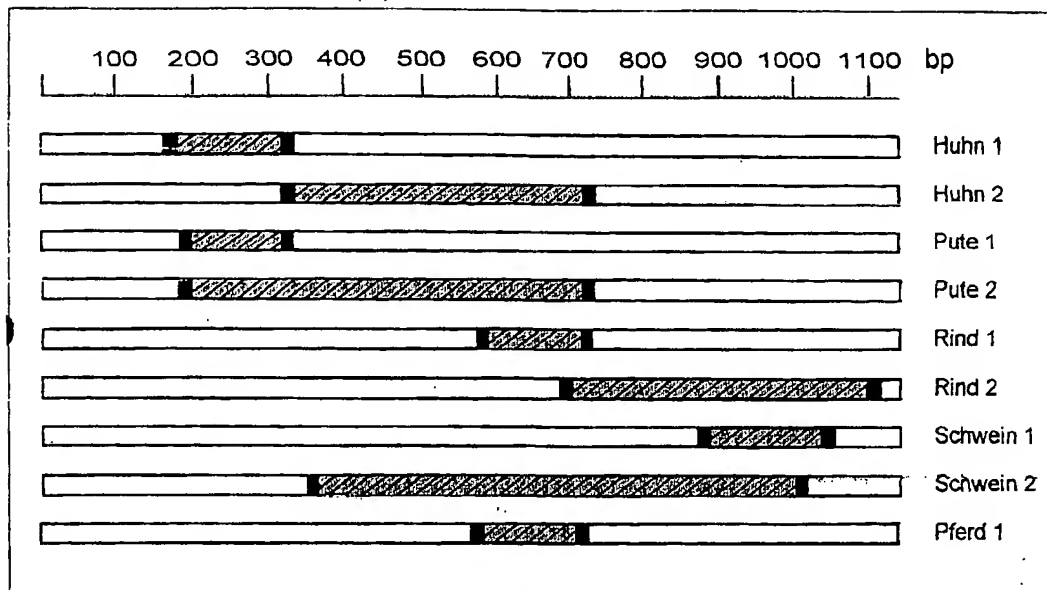


Fig. 1:
Lage der artspezifischen PCR-Primer auf dem Cytochrom b - Gen. Die Primer sind als schwarze Flächen (■) gezeichnet, die die daraus resultierenden PCR-Produkte (▨) links und rechts begrenzen; bp = Basenpaare

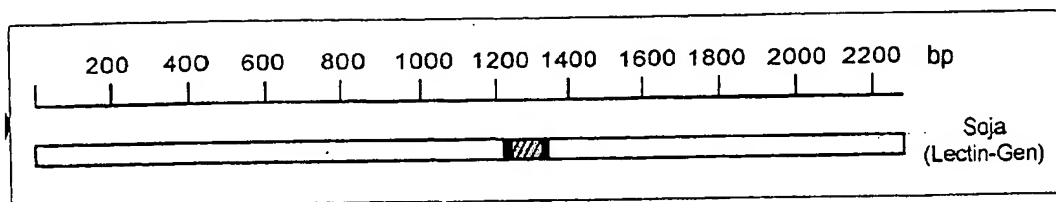


Fig. 2:

Position der sojaspezifischen PCR-Primer (■) und des entsprechenden PCR-Produktes (■) auf dem Soja Lectin-Gen; bp = Basenpaare

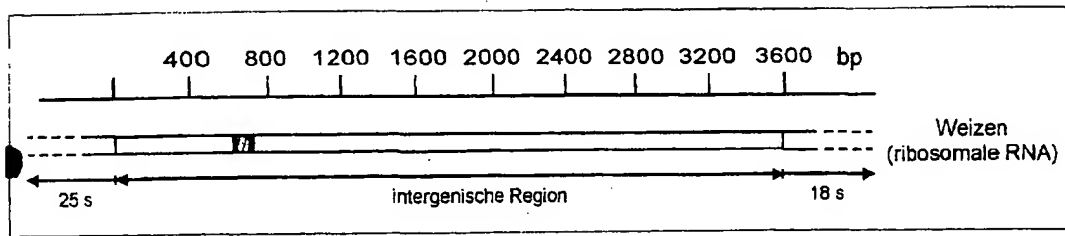


Fig. 3:

Lage der weizenspezifischen PCR-Primer (■) und des entsprechenden PCR-Produktes (▨) im intergenischen Bereich der 25s- und 18s RNA-Gene; bp = Basenpaare

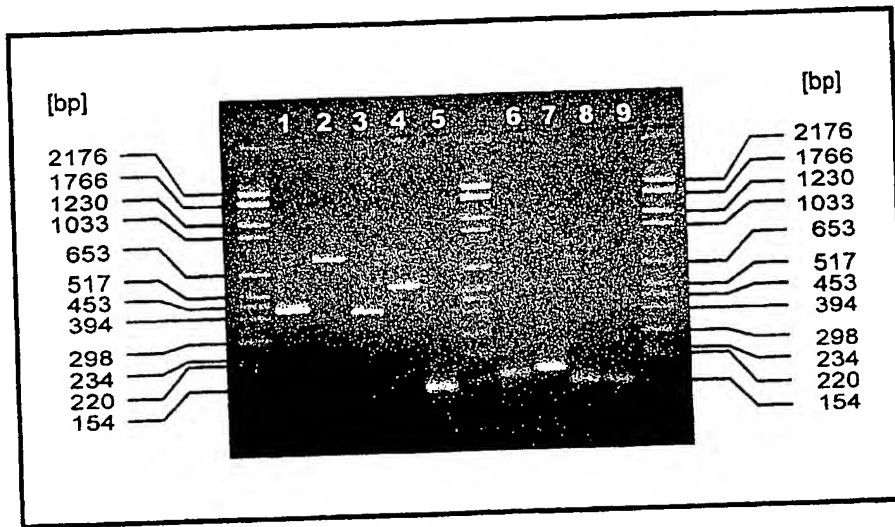


Fig. 4:
 Tierartspezifische PCR-Produkte aus je 1 %igen Fleischmischungen
 der jeweiligen Tierarten.

In den Spuren:

- 1: Rind 2
- 2: Schwein 2
- 3: Huhn 2
- 4: Pute 2
- 5: Pferd 1
- 6: Rind 1
- 7: Schwein 1
- 8: Huhn 1
- 9: Pute 1

Links, rechts und in der Mitte sind DNA-Längenstandards aufgetragen.
 Die Fragmentlängen sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

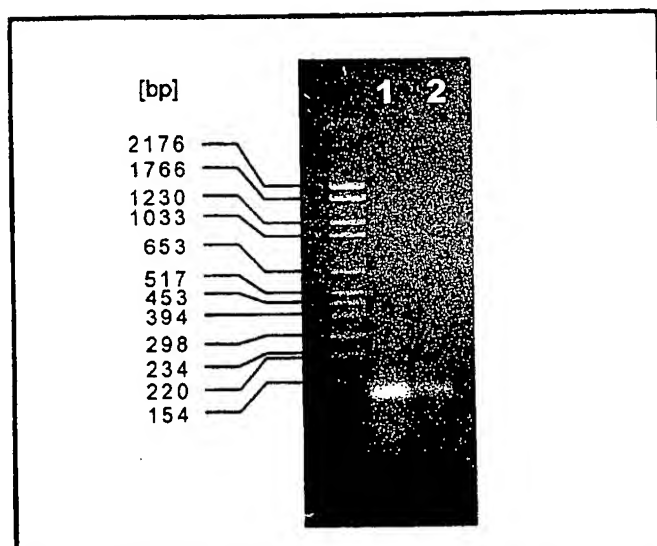


Fig. 5:
Pflanzenartsspezifische PCR-Produkte aus jeweils 0.01 %igen
Zumischungen von Weizen (Spur 1) und Soja (Spur 2).
Links ist ein DNA-Längenstandard aufgetragen.
Die Fragmentlängen sind in Basenpaaren (bp) angegeben.